

## Részletes zárójelentés

A 2004-2006 közötti időszak során három kutatási területen értünk nemzetközileg is kimagasló eredményeket. Ezek a kutatások számos olyan projekt elindítását tették lehetővé, amelyeken jelenleg is aktívan dolgozunk.

### A fitokróm-A sejtmagi importjának szabályozása

Kutatásainkkal bebizonyítottuk, hogy a fitokróm-A fotoreceptor indukálta jelátviteli lánc egyik alapvető és legkorábbi lépését, a fitokróm-A molekulák sejtmagba történő importját egy eddig azonosítatlan fehérje, az FHY1 fehérje szabályozza. Kimutattuk, hogy az FHY1 fehérje hiányában a fitokróm-A fehérje nem akkumulálódik a sejtmagban és az FHY1 mutáns növények fitokróm-A hiányos mutáns fenotípusához nagyon közeli fenotípust mutatnak. Élesztő két-hibrid kísérletekkel bizonyítottuk, hogy a fitokróm-A konformáció-függő módon (a biológiailag aktív Pfr konformációban) képes specifikusan kölcsönhatni az FHY1 fehérjével és az aktív kölcsönhatáshoz az FHY1 fehérje N-terminális doménje szükséges. Kutatási eredményeink valószínűsítik, hogy a fitokróm-A receptor egy fehérje-komplex egyik alkotórészeként importálódik a sejtmagba és e komplex szerveződésében az FHY1 fehérjének meghatározó szerepe van. A kísérletek alapján szintén valószínűsíthető, hogy az FHY1 fehérje mellett az FHL fehérje (az FHY1 fehérje egyetlen növény-specifikus homológja) is szerepet játszik ezen import komplex szerveződésében, hiszen az *fhy1-fhl* dupla null növények fenotípusa azonos a fitokróm-A null mutáns fenotípusával. Azok a kísérletek, amelyek eldönthetik, hogy az FHY1-FHL fehérjék – túlmenően azon, hogy közvetítik a fitokróm-A sejtmagi importját – szerepet játszanak-e a sejtmagban lokalizált fotoreceptor stabilizációjában ill. degradációjában, folyamatban vannak. Ezek a kísérletek azt mutatják, hogy a fitokróm-A sejten belüli lokalizációját a fitokróm-B-től markánsan különböző molekuláris mechanizmus

szabályozza, hiszen a fitokróm-B sejtmagi importját jelenlegi ismereteink szerint a klasszikus NLS domain-importin kölcsönhatáson alapuló importrendszer szabályozza. Előzetes megfigyeléseink arra engednek következtetni, hogy az *fhy1-fhl* dupla null mutáns növényekben a fitokróm-A nem mutatható ki a sejtmagban, viszont western hibridizációs kísérleteink alapján a fitokróm-A szintje ill. fényindukált lebomlása nem tér el jelentősen a vad típusú növényétől. Meglepetésünkre azonban az *fhy1-fhl* dupla mutáns a vad típusú növénnel azonos időben virágzik (a *phyA* null mutáns korán virágzik), ami azt mutatja, hogy a virágzás idejét szabályozó fitokróm-A jelátviteli lánc működéséhez – ellentétben a hipokotil elongációval – nem szükséges a fotoreceptor sejtmagi importja, ezt a jelátviteli láncot a citoplazmában lokalizált fitokróm-A kontrollálja.

### ***A fitokróm-A autofoszforilációjának biológiai jelentősége***

A fitokróm fotoreceptorok atipikus szerin-treonin kinázok, amelyek autofoszforilálódnak és számos más fehérjét foszforilálnak. A fitokróm-A autofoszforilációjának biológiai jelentősége ismeretlen volt egészen a közelmúltig. Ezen a területen jelentős haladást értünk el az elmúlt évek során, mivel munkacsoportunk egy koreai kutatócsoporttal végzett kollaborációs kutatásai során bebizonyította, hogy a fitokróm-A autofoszforilációja a fény indukálta jelátviteli lánc de-szenzitálásában játszik szerepet. Izoláltunk egy olyan mutánst, amelyből hiányzik az a specifikus foszfatáz, amely fény- és konformációfüggő módon defoszforilálja a fitokróm-A molekulát. A mutáns fenotípusát vizsgálva kimutattuk, hogy ez a mutáns hiposzenzitív, a fitokróm-A null mutáns fenotípusához közeli fenotípust mutat. A specifikus foszfatázt kódoló gént túlexpresszázó transzgénikus növények viszont markáns hiperszenzitivitást mutattak. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a fitokróm-A autofoszforilációja ugyan nem szükséges a jelátviteli lánc indukálásához, de nagyon fontos szerepet játszik a

jelátviteli lánc aktivitásának szabályozásában egy olyan, jelenleg részleteiben ismeretlen molekuláris folyamat részeként, amely a fitokróm-A molekulák inaktivációját eredményezi. Kimutattuk, hogy ez az inaktiváció nem befolyásolja a fitokróm-A sejten belüli eloszlását ill. stabilitását. Kimutattuk ugyanis, hogy foszforilálódni nem képes mutáns fitokróm-A molekulák sejten belüli eloszlása ill. degradációja nem különbözött jelentősen a vad típusú fotoreceptorétól. Ezzel ellentétben viszont sikerült kimutatnunk, hogy a fitokróm-A és a PIF3 transzkripció faktor kölcsönhatásának erősségét a fitokróm-A foszforiláltsági szintje jelentősen befolyásolja oly módon, hogy a fitokróm-A foszforilációja gátolja ezen kölcsönhatás kialakulását. Így valószínűsítjük, hogy a jelátvitel intenzitásának szabályozása legalább részben e molekuláris folyamat révén valósul meg. Annak eldöntésére, hogy a fitokróm-A nem autofoszforilációs aktivitása milyen szerepet játszik a jelátviteli lánc működtetésében, jelenleg végzünk kísérleteket. Ezek során olyan deléciós fitokróm-A mutáns fotoreceptor molekulákat fejeztetünk ki fitokróm-A null mutánsokban, amelyekről bizonyítottuk élesztősejtekben, hogy elvesztették foszforilációs képességüket, de még képesek autofoszforilálódni. A regenerált transzgénikus növények fenotípusának analízise várhatóan segíteni fog e kérdés megválaszolásában.

### **A fitokróm fotoreceptorok egyik alapvető funkciója a fotomorfogenezist negatívan szabályozó transzkripció faktorok lebontásának szabályozása**

A fitokróm fotoreceptor-család tagjai több, igen bonyolult, sok komponenst tartalmazó jelátviteli lánc aktiválása révén szabályozzák kb. 2500 gén kifejeződését *Arabidopsis thaliana*-ban. E jelátviteli láncok közös jegye, hogy mindegyik tartalmazza egy vagy több tagját az ún. PIF (fitokróm interacting factor) bHLH (bázikus-helix-loop-helix) domént tartalmazó transzkripció faktorokat kódoló géncsaládnak. E géncsalád működéséről az volt az elképzelés, hogy pozitív módon, közvetlenül a fotoreceptorokhoz

kötődve aktiválják a fényindukált gének transzkripcióját. Egy viszonylag komplikált kísérletsorozattal azonban bebizonyítottuk, hogy – ellentétben az általánosan elfogadott nézettel – ezek a transzkripció faktorok nem pozitív, hanem negatív regulátorai a fitokróm aktiválta jelátviteli láncnak. Kimutattuk továbbá, hogy a fitokróm-PIF fehérje kölcsönhatás az első lépése e negatív regulációs fehérjék lebontásának, ezt a kölcsönhatást a fotoreceptor foszforiláltsági szintje befolyásolja és a sejtmagban lokalizált fitokróm molekulák egyik legfontosabb funkciója e negatív regulációs faktorok fényfüggő degradációjának szabályozása. Konkrétan a PIF3 transzkripció faktor degradációját vizsgálva kimutattuk, hogy ezt a fitokróm-A, B és D fotoreceptorok együttesen kontrollálják. Ezek az eredmények alapjaiban változtatták meg a fényindukált jelátviteli lánc működéséről alkotott korábbi elképzeléseinket. Meghatároztuk továbbá, hogy a PIF3 degradációja gyors, fény hatására a fehérje 10-15 percen belül lebomlik és hogy a PIF3 és más PIF fehérjék lebontásának egyik lépése olyan nukleáris fehérjekomplexek kialakulása, amelyek mind a fitokróm receptorokat, mind a PIF fehérjéket tartalmazzák. E komplexek kialakulásának gátlása akadályozza a PIF fehérjék fényindukált degradációját és hiposzenzitív fenotípus kialakulását eredményezi. Bebizonyítottuk, hogy – szintén ellentétben a korábbi elképzelésekkel – a PIF3 fehérje nem játszik szerepet a cirkadián óra működésében.